Abstrakt

Cílem této dizertační práce byla syntéza nových nukleosidů, nukleotidů a příslušných DNA sond nesoucích různé fluorescenční značky pro bioanalytické aplikace.

V první části práce byl pomocí Sonogashiry cross-kapling reakce syntetizován 2'-deoxycytidin a jeho trifosfát nesoucí imidazolinový fluorofor na bázi tryptofanu. Daný fluorofor vykazoval citlivost na pH a viskozitu. Nukleotid byl použit pro konstrukci modifikovaných oligonukleotidů (ON) a DNA prodlužováním primeru (PEX) nebo polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Značená ON sonda byla použita pro snímání interakce se single-strand vazebným proteinem, což vedlo ke zvýšení intenzity fluorescence modifikovaného ON.

Dále byl připraven thymidin a thymidin-5'-*O*-trifosfát, nesoucí benzyliden-tetrahydroxanthyliový fluorofor, pomocí mědí katalyzované azid-alkynové cykloadice (CuAAC). Fluorescence fluoroforu je závislá na polaritě a viskozitě prostředí. Inkorporace modifikovaného nukleotidu do DNA pomocí PEX nebo PCR vedlo k dramatickému zvýšení fluorescence, pravděpodobně díky interakcím fluoroforu ve velkém žlábku. Bohužel, modifikovaný nukleotid nebyl vhodný pro vizualizace v buňkách kvůli své cytotoxicitě. Modifikovaná dsDNA byla použita jako fluorescenční sonda pro snímání interakcí s malými molekulami a proteiny změnou fluorescence. Nakonec byl nukleotid aplikován v real-time PCR, jako nový způsob přímé vizualizace syntézy DNA. Benzyliden-tetrahydroxanthyliový fluorofor byl také připojen k 2'-deoxycytidinu přes triethylenglykolový linker, aby se vyřešili problémy s buněčnými experimenty, nicméně začlenění do DNA v živých buňkách nebylo úspěšné.

Následně, 2'-deoxycytidin a jeho trifosfát modifikovaný thiazol orange (TO) byly také syntetizovány pomocí CuAAC. Je známo, že TO váže nukleové kyseliny a mění intenzitu fluorescence a lifetime v závislosti na viskozitě. Nukleotid byl inkorporován do DNA sond pomocí PEX a PCR a byly hodnoceny jejich fotofyzikální vlastnosti. TO-modifikovaný nukleotid byl úspěšně transportován do živých buněk a začleněn do genomové DNA, což umožnilo zobrazení syntézy DNA v živých buňkách v reálném čase pomocí fluorescenčního zobrazování.

Dále byl připraven 2'-deoxycytidin a jeho trifosfát nesoucí near-infrared BODIPY fluorofor navázaný přes propargylether nebo triethylenglykolový linker. Nové nukleosidy prokázaly závislost doby života fluorescence na viskozitě prostředí. Odpovídající

nukleosidtrifosfáty byly použity jako substráty pro enzymovou syntézu DNA. Modifikované DNA sondy byly použity pro monitorování interakcí s proteiny změnou doby života fluorescence. Nukleotid nesoucí BODIPY vázaný přes triethylenglykolový linker byl také enzymově zabudován do DNA v živých buňkách.

Nakonec byl připraven i 2'-deoxycytidintrifosfát nesoucí křemíkový rhodamin fluorofor pomocí strain-promoted azid-alkyn cykloadiční reakce. Byly studovány fotofyzikální vlastnosti a také enzymatická inkorporace do DNA. Nový nukleotid byl transportován do buněk, inkorporován do genomové DNA a umožnil zobrazení DNA s vysokým rozlišením.